幾丁質的切片方法和軟化劑 (Diaphanol) 的製法

王 鳳 振

（第 一 軍 醫 大 學）

節足動物如甲殼類、多足類、蜘蛛類和昆蟲類，都披着幾丁質的外骨骼。其他動物如軟體動物和環蟲類動物的口器，苔蘚蟲類和藪枝蟲類的外鞘，乃至蛔蟲的卵殼，也由幾丁質形成。在植物界，有許多菌類的細胞膜，含着幾丁質。脊椎動物則大都有角質裝備，如爪、甲、角、蹄及皮毛等等，都含有大量的角質。

幾丁質和角質，都很堅韌，在切片技術上，成了個困難問題。國內國外很少或完全沒有注意到這個問題，所以特別提出來和同道們商討。

一、幾丁質的化學性質

幾丁質的化學成分爲 $(C_8H_{13}O_5N)x$ 在水，酒精，乙醚，有機溶劑，煮沸的鹼類及稀薄的無機酸類等溶液中，不能溶解。但在熱濃硫酸，熱濃鹽酸，及無水蟻酸中，能溶解。

在自然界中，幾丁質不能單獨存在，常和碳酸鈣，鈣鹽或矽酸等混和，形成甲殼類動物或鱟（*Limulus*）等的硬甲，或者和碳水化物混合，形成昆蟲或蜈蚣蜘蛛等的幾丁質外皮，鈣質多時，則硬度加大，碳水化物多而無鈣質時，則韌性加大。

用飽和的氫氧化鈉或氫氧化鉀水溶液，煮幾丁質，則變成甲精（Chitosan）。用碘液（碘 0.2 克，碘化鉀 2 克，水 200 毫升）試驗甲精，有紅紫色反應。

二、固定方法

因爲幾丁質相當堅韌，所以必須用透力很大的固定液，以下幾種固定液，對一般的節足動物，都很適用。溶液以臨時配合爲原則，陳舊液體，作用減弱，不宜使用。固定材料須生鮮，太大標本，可以剪段或刺孔，以便浸透。

1. Carnoy 氏液

無水酒精 (absolute alcohol)	6 毫升
氯仿 (chloroform)	3 毫升
冰醋酸 (glacial acetic acid)	1 毫升

2. Carnoy-Lebrum 氏液

無水酒精、氯仿、冰醋酸 等量，使升汞 (mercuric chloride) 飽和

以上二液，透力相當大，每4小時可以浸透2.9毫米的材料，所以1—2毫米厚的材料，固定1—2小時即可。3—5毫米厚的材料3—5小時即可。時間太久，引起收縮或過度硬化，

3. Romeis 氏溶液

昇汞飽和水溶液	25 毫升
三氯醋酸 (Trichloracetic acid)	20 毫升
甲醛 (Formalin)	5 毫升

固定時間，2毫米厚或較小材料，1—2小時即可，3毫米厚或較大的材料，3－24小時，固定後，直接用酒精80—90%洗幾次，然後保存於70%酒精中。

4. Stieve's "Tripiform"

苦酸飽和水溶液 (picric acid. sat. aq.)	140 毫升
三氯醋酸 5%	10 毫升
甲醛	10 毫升

固定時間同上

5. Heidenhain's "Susa"

昇汞	4.5 克
食鹽	0.5 克
蒸溜水	80 毫升
三氯醋酸	2 克
冰醋酸	4 毫升
甲醛	20 毫升

固定時間1—24小時，固定後直入90%酒精中。

6. Heidenhain's "Susa"

昇汞飽和水液	100 毫升
三氯醋酸	2 克
氷醋酸	1 毫升

固定時間 1—24 小時

7. Smith 氏液

苦酸飽和水溶液	90 毫升
酒精（80—90%）	90 毫升
甲醛	10 毫升
氷醋酸	10 毫升

固定時間 1 天

8. Duboscq-Brasil 氏液

酒精 80%	150 毫升
苦酸	1 克
甲　醛　60 毫升 } 臨用時加入	
氷醋酸　15 毫升 } 臨用時加入	

固定時間 1 天

9. Petrunkevitch 氏第一液

蒸溜水	300 毫升
無水酒精	200 毫升
硝酸	10 毫升
氷醋酸	90 毫升
昇汞	20 克

固定時間 ½—6 小時，透力極大

10. Petrunkevitch 氏第二液

酒精 60%	100 毫升
硝酸（比重 1.41—1.42）	3 毫升
乙醚	5 毫升
硝酸銅（cupric nitrate）	2 克
對硝基苯酚（paranitrophenol）	5 克

固定時間: 透力每小時爲 0.5 毫升, 但固定寧久勿暫, 因此種液體, 固定稍久, 亦不損組織, 我常用它固數週, 乃至一年, 亦可切片。

11. Gilson 氏液, 與上液相似, 配法稍異

蒸溜水	880 毫升
酒精 60%	100 毫升
昇汞	20 克
鹽酸(比重 1.456)	15 毫升
冰醋酸	4 毫升

固定 $\frac{1}{2}$—6 小時, 以後用酒精 60% 洗, 再保存于 70% 酒精中。

12. Hennig 氏液

鉻酸 (chromic acid) 0.5% 水溶液	8 毫升
昇汞飽和于 60% 酒精	12 毫升
苦酸飽和水溶液	6 毫升
硝酸	8 毫升
無水酒精	21 毫升

固定 1—4 小時

至於個別動物, 亦常有個別方法。略舉如下:

1. 甲殼類動物如水蚤 (Daphnia) 類, Zimmer 氏用下種溶液。

乙醚	50 毫升
無水酒精	10 毫升
苦酸飽和於以上二液中約	1 克

固定 1—10 分鐘, 保存於 70% 酒精中。

2. 熊蟲 (Tardigradea) 用 Hennig 氏液固定。

3. 跳蟲 (Collembola) Hoffmann 氏用以下液固定

四氯化鉑 (Platinum chloride) 1% 水溶液,	10 毫升
昇汞飽和水溶液	5 毫升
酒精 95%—100%	5 毫升
冰醋酸	1 毫升

在 60°C 溫箱中, 固定 1—2 分鐘, 取出放涼繼續在原液中固定 2 小時。

4. 多足蟲類 (Myriapoda) 用 Smith, Duboscq-Brasil 或 Hennig 或其他含昇汞

或苦酸等溶液固定,

5. 蜘蛛類 (Arachnida)

脫皮後幾丁質尚未硬化時,用 Smith., Duboscq, Romeis 或 Stiere 氏 Tripiform 固定均好,

幾丁質硬化後或老年蜘蛛,用 Petrunkevitch 氏液最好,用以上兩種方法,不經過軟化手續,也能切片,

許多人用燒熱的固定液,固定節足動物,可以減少固定時間,但其組織,往往變形,不如用冷固定液結果良好,如繭一非用加熱法固定時,溫度以不超過 60°C為宜。

又經固定後而切片無好結果時,大都不外兩個原因,一是固定時間沒有掌握好,一是固定液過於陳舊,所以固定液以臨時配合為原則。固定的材料,要依其大小厚薄,變更固定時間,

三、軟化方法

初脫皮的昆蟲或蜘蛛,不經特別强烈軟化劑,僅用稍含軟化劑固定,便可切片,如 Smith, Duboscq, Petrunkevitch Zilson 等含有苦酸,三氯醋酸,硝酸等之固定液,

硬化後的幾丁質外皮或稱外骨骼,便沒有這麼簡單,用以上幾種固定液,免强可以切片,結果幾丁質的外骨骼,總是殘缺不完,同時也影響了內部的柔軟組織,所以節足動物的切片技術上,總留着一些困難問題:

1922 年德國的舒爾斯教授 (Paul Schulze) 利用二氧化氯加冰醋酸為軟化幾丁質的藥劑,用壁蝨(ticks)作了許多實驗得到成功,遂名之為 Diaphanol,譯成中名為軟化劑或者透明劑,按字源應譯為透明劑,按作用,它有漂白,退色,透明的能力,而其特別作用,就是軟化幾丁質,和角質,所以譯為軟化劑,也很恰當,

舒爾斯教授的軟化手續如下:

1. 固定:選擇一種適宜的固定液,固定生鮮材料,

2. 酒精洗:固定後,因固定液的性質不同,用水或用酒精洗濯材料,如用水洗後,則依次經 50% 酒精,再入 65% 酒精中。如用高度酒精洗後,則依次降至 65% 酒精,如材料過於柔嫩,用水洗後,依次經過高度酒精,由 50%→65%→80%→95%,充分硬化,再依次降至 65% 酒精中。

3. 軟化:用軟化劑 (Diaphanol),材料由 65% 酒精放入軟化劑中,

軟化時間,依幾丁質的厚薄而定,如壁蝨需時3、4日老蜘蛛需時6、7日,甲蟲需時10—14日,

軟化過程中,應注意之點:第一、軟化劑須多於軟化物30—50倍。第二、軟化劑及材料,須保存於深褐色磨沙口玻璃瓶中,最好在瓶塞上塗凡士林,使其緊緊塞住,以防氯氣之透出,第三、軟化劑爲一種金黄色液體,在軟化過程中,時時有氯氣泡湧出;每當氯氣揮發完後,則軟化劑退色,呈淺黄色,再無氣泡發生應即換新液一次,第四、軟化劑遇高熱或强光,則揮發或分解。故須在室温並在暗處,進行工作,不宜在有光處或高温中工作。

4. 軟化後用65%酒精洗濯,換酒精數次。依次用65%→50%酒精→蒸溜水洗濯,

5. 中和酸性用下液,時間6—12小時,不得超過24小時。

硫代硫酸鈉(sodium thiosulphate)	2.5%水溶液	等份
硝酸鈉	5%水溶液	

經軟化的材料,初入中和劑時,立刻有混濁色沉澱,換新液數次,至無混濁沉澱爲止,所用時間,約在6—12小時之間。

6. 流水洗6—12小時,較厚或較大的材料,洗24小時。

7. 脫水,依次經過各級酒精50%→65%→80%. 每級2—3小時。

8. 去酒精,用醋酮2—3小時,換新液兩次再入等量之醋酮苯(acetone benzol 1:1)1小時。

9. 透明,用苯(Benzol=Benzene)½—1小時,較大材料需時3—6小時,至透明爲止,在苯中浸24小時,材料亦不至過分變硬,苯的作用,比較緩和,不如蓍或二甲苯(Xylol)快,所以也沒有蓍的缺點,使材料過度硬化,碎化,

10. 石蜡封埋:

第一步,等量之苯及土蜡(benzol-paraffin)2—3小時。

第二步,純土蜡2—3小時,如材料太大或太厚時,在土蜡中浸潤2—3日亦可,因土蜡浸潤不透時,絕不能作完整切片,同時經醋酮和苯處理的材料,在土蜡中,也不至過分硬化,

茅勒(Moller)氏軟化法:

如材料過於柔軟嬌嫩,可用茅勒氏的棉膠土蜡混合法,軟化手續如次:

1. 固定,用Smith, Duboscq, Petrunkevitch等固定液均可。

2. 脫水，經過各級酒精，30→50→65→80→95→100% 各 2—3 小時。

3. 無水酒精及以太等份液 (alcohol absolute + Ether 1:1) 1 日。

4. 棉膠，2%→4%→8% 各 3—7 日。

5. 硬化用，氯仿或酒精，2—3 日。

6. 硬化後入 65% 酒精中，並切去邊緣的棉膠，僅保留材料周圍 1 毫米的棉膠，以保護材料。

7. 軟化用二氧化氯 30 毫升 加硝酸 3毫升 時間 3—18 日，常換新液。

8. 中和用等量的硫代硫酸鈉 (2.5%) 及硝酸鈉 (5%)，常換新液至無混濁沉澱。時間 3—12 小時。

9. 流水洗 12—24 小時。

10. 脫水，用各級酒精 50→65→80→95%

11. 透明，用亞拔特氏混合油劑 (Apathy's oil mixture) 3—4 日。

亞拔特氏混合油劑配法：

氯仿	40 毫升
唇形花油 (Origanum oil)	20 毫升
香柏油 (Cedar oil)	40 毫升
石碳酸 (carbolic acid)	10 克
無水酒精	10 毫升

以上各藥物，須絕對無水，方可使棉膠塊透明，如棉膠呈乳褐色，則表示藥品並不純粹，須將棉膠塊退入酒精中，再另配新油劑。每日換新油劑一次。用過的油劑，多少含有水分，可以加入乾燥的硫酸鈉 (Sodium suephate) 吸收之。

12. 去油，用苯 (benzol) 2—3 小時。

13. 封蜡：第一步，等量的苯及土蜡 2—3 小時。

第二步，純土蜡 6—24 小時。或 2、3 日。

軟化後用氷凍切片法

如材料太大外骨骼太厚時，用土蜡或棉膠封埋，太費時間。可用氷凍切片法。手續如下：

1. 固定：全前

2. 軟化：

堅厚甲殼如鱟魚，蝦，蟹等，可用二氧化氯加硝酸 ($ClO_2 + HNO_3$) 軟化，稍薄

外骨骼，如蝗蟲，蜈蚣，蠍子等可用二氧化氯加醋酸或單加二氧化氯軟化。屢換新液，至材料呈白色，以針穿透時爲止。

3. 中和，同前法 12—24 小時。

4. 流水洗 6—12 小時。

5. 再行固定，甲醛 10%。

6. 氷凍切片。

7. 水洗過兩小時。

8. 染色。

9. 脫水，以加拿大膠封在載玻璃及蓋玻璃間。

四、幾丁切片應注意的事項

軟化及切片過程中，常因手續之疏忽，引起收縮，組織變形，染色不良及已經軟化之材料，經過封埋，重新變硬。欲矯正此種缺陷，必須注意以下各點：

1. 組織的變形或損壞，不外以上三個原因，

（1）固定的時間太短，固定劑沒有浸透。因此必須選擇適當的固定劑，嚴格的掌握固定時間。

（2）軟化時間太久，軟化劑損壞了組織。試驗軟化的程度，有兩個標準：一、軟化材料，完全漂白，差不多快成透明的狀况。二、用尖針很容易將材料刺穿。達到這兩個標準時，可以中止軟化步驟。

如材料過於柔嫩或太小，不便用針刺穿時，可在軟化劑中加入昇汞，至飽合程度，（每 100 毫升軟化液加六克昇汞）。則組織不易損壞。

（3）軟化劑過於陳舊，或軟化過程中，不換新液，使組織易受損壞。軟化劑爲金黃色液體，二氧化氯，易於蒸發，在日光及高濕中，更加速分解；故保存軟化劑及在軟化過程中，必用磨砂口玻瓶，並且用凡士林密封住瓶口，在平常室溫，無光的地方，須用深褐色玻璃瓶。陳舊的及用過的軟化劑，二氧化氯多半蒸發，不應再用。軟化過程中，二氧化氯蒸發後，軟化劑變成淺黃時，應立刻換新藥。

2. 軟化的材料，經過封埋時，又有變硬現象。其原因大都由於無水酒精及二甲苯的影響。二者作用太快，容易使材料收縮變硬，在切片時，容易破碎。所以脫水時應以醋酮代替無水酒精，透明應用苯（benzol）代替二甲苯，或用氯仿代替二甲苯。則時間雖久，亦不變硬。

3. 土蜡封埋，切片較薄，材料收縮程度較大，容易破碎。氷凍切片較快，但切片太厚。想避免材料的收縮，且得完整切片，可以用純棉膠封埋，切片較氷凍切片稍薄。如欲得到完整而且極薄的切片，最好用棉膠土蜡混合法封埋，3—5 微米厚的切片，可以很容易做到。

4. 軟化後的切片，染色不好的原因，大都由於氯氣沒有洗淨。所以軟化後應以 65% 酒精，充分洗濯，多換幾次酒精，至材料完全不帶黃色爲止。

五、軟化劑的製法

軟化劑或透明劑（Diaphanol）是一種最好的軟化幾丁質的溶液。給昆蟲學者和組織學者解决了幾丁質切片技術上的困難。自從 1921 年舒爾斯教授發明這種溶液，應用在壁蝨（或名蜱 Ticks）切片方法上後，至今爲全世界的組織學者所採用。舒爾斯教授是當代壁蝨研究的權威。作者在德國時期，因爲鑑定中國的壁蝨，曾在洛斯陶克（Rostock）大學舒氏實驗室裏，工作過一個時期。同時也學了一些方法。見他製造軟化劑的方法，相當簡單，自己因爲研究蜘蛛類動物的關係，也曾照樣製作了一些軟化劑。在我國既然無處購置這種溶液，在實驗室中自己製造，並不困難。所以願意介紹出來，供國內同道的參考。

欲製 220 毫升軟化劑時，需用下列各種器皿及藥品：

1. 玻璃器。

（1）玻璃缸一個，容量 1000 毫升，磨沙口緣，帶毛玻璃蓋。

（2）燒杯或磁甜鍋一個。容量 100 毫升

（3）方玻璃塊一個，或數個，因厚薄而定。

2. 藥品。

（1）氯酸鉀（potassium chlorate, $KClO_3$）12 克

（2）濃硫酸 44 毫升

（3）氷醋酸 110 毫升

（4）蒸溜水 250 毫升

（5）凡士林。

3. 製造手續：如圖 1

（1）先將醋鹽及蒸溜水各 110 毫升混合，置於玻璃缸中。

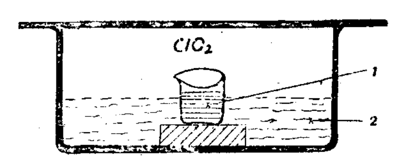


圖 1　製造 Diaphanol 的裝置

1. 12 毫升水，44 毫升硫酸12克氯酸鉀

2. 110 毫升水，110 毫升冰醋酸

(2) 再將濃硫酸 44 毫升滴入蒸溜水12毫升。時時攪和, 放凉, (注意! 不可將水加於濃硫酸中, 致生爆濺危險), 注入燃杯中。

(3) 將盛硫酸液的燒杯, 放在玻璃缸裏, 燒杯下面, 用玻璃塊墊高。使燒杯內液體水平面, 高出玻璃缸水平面。

(4) 將氯酸鉀 12 克, 加入燒杯中, (注意! 不可磨研, 以防爆炸) 立刻抹凡士林於毛玻璃蓋邊上, 蓋在玻璃缸上, 此時可見有黃色的二氧化氯氣體生出, 漸漸溶於稀醋酸液中, 將液體變成金黃色 這就是軟化劑透明劑(Diaphanol)。

(5) 兩天以後, 二氧化氯完全溶解到稀醋酸中, 取出燒杯及玻璃塊, 將金黃色的透明劑, 注入褐色磨沙口瓶中, 加凡士林將瓶口塞好, 保存在冷暗的地方。以備應用。

以上各種手續, 須避日光及高熱, 並因二氧化氯為一種毒氣, 應在通風廚或無人的房間工作。

1926 年柏林大學的德蘭 (Drahn) 教授, 用舒爾斯的透明劑軟化馬蹄牛角等巨大的角質, 也相當好。不過發現了兩種缺點: 就是馬蹄牛角在透明劑中軟化時間, 要用幾個星期, 因為醋酸的副作用, 使結締組織膨脹, 並細胞核的染色, 也很受影響, 甚至染不上顏色。因此他有一個改良的方法。就是先製造單純的二氧化氯水溶液。然後再按各種需要, 加入不同的酸類。

製造 500 毫升的二氧化氯的水溶液, 所需物品及手續如下:

1. 玻璃器材, (裝置如圖 2)

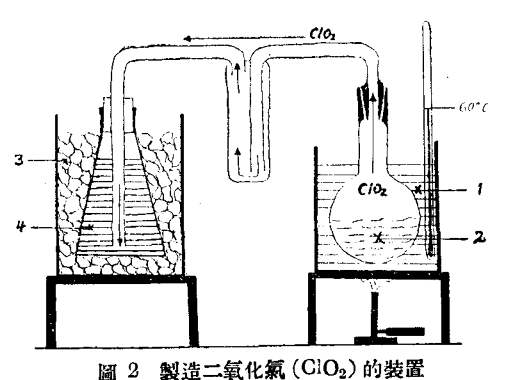


圖 2 製造二氧化氯 (ClO_2) 的裝置
1. 水浴缸 2. 草酸 150 克. 氯酸鉀 40 克, 蒸溜水 20 毫升 3. 冰 4. 蒸溜水 500 毫升

(1) 錐瓶一個, 容量 750 毫升

(2) 燒瓶一個, 容量 400—500 毫升

(3) U 字形玻璃管兩個

(4) 寒暑表一個

(5) 水浴缸一個或鐵質銅質均可

(6) 大玻璃缸或鐵銅質均可

2. 藥品及其他

(1) 草酸粉末 150 克。

(2) 氯酸鉀 40 克。

(3) 蒸溜水 600 毫升

（4）酒精燈或煤氣燈一個

（5）冰塊若干。

3. 製造手續，

（1）將錐瓶置於大玻缸中，瓶外加冰，瓶中加蒸溜水 500 毫升

（2）將燒瓶外置於水浴缸中，再將草酸粉末 150 克與氯酸鉀 40 克，徐徐混合，慢慢攪和，然後加入燒瓶中。最後加入蒸溜水 20 毫升。

（3）將各種瓶塞塞好。玻璃管連好，然後在水浴缸下加熱，水溫保持 60°C，一切手續在暗處進行。

（4）二氧化氯氣體漸漸由燒瓶經過玻管入錐瓶中，溶於水內。直至燒瓶的藥品。不再發生氣體時，即可停止。

（5）將錐瓶的二氧化氯水溶液，注入褐色瓶中，封好瓶口，在冷暗處保存，以備應用，

4. 應用方法：因材料的不同，可以臨時配成四種溶液。

（1）單純的二氧化氯水溶液。作用較為緩和，適宜於小材料，

（2）舒爾斯氏透明劑，配合如下：

二氧化氯水溶液加等量的純冰醋酸，

作用較強，但軟化時間超過一兩周時，往往使結締組織膨脹，故對小材料及稍大材料，較為適宜，

（3）二氧化氯水溶液 10 毫升，加純硝酸 1 毫升，

（4）二氧化氯水溶液 10 毫升，加純硫酸 1 毫升，

以上二種混合液，作用最好，對於堅硬巨大材料，最為適宜，雖軟化時間，在數周以上，亦無損壞組織或引起膨脹之危險，對於小材料，亦可適用，德蘭氏認為二氧化氯與硝酸之混合液，最為完美。

5. 各種混合液的利弊。

（1）舒爾斯氏透明液，對於軟化節足動物的幾丁質，最為適宜，因為不但有軟化作用，而且有透明作用，唯對於堅硬的角質不合適，因為冰醋酸有透明作用，若時間過久，亦有使結締膨脹，且使細胞核不易染色，

（2）二氧化氯作用稍慢，二氧化氯加硝酸或硫酸，作用最強，材料大小軟硬，幾丁質和角質，均可應用。但三者均透明作用，又因它們的軟化力強或需時太久，往往使材料過於柔軟。德蘭氏為矯正這種缺點，更進以下手續：

1. 軟化後，用流水洗6—8小時。

2. 透明，用下液處理，時間不可太久，以材料透明爲止。約需6—12小時過久則材料受損細胞破壞。

亞硝酸鈉飽合水溶液100毫升

濃硝酸20—30滴

3. 酒精50%12小時，連換新液數次，然後依次入高度酒精脫水。

(3) 二氧化氯水溶液，不可與鹽酸或草酸混合。因二者均使組織膨脹，不宜於軟化作用。

六、總　結

1. 節足動物在脫皮後，外骨骼未硬化前，固定，切片，最爲簡便。

2. 硬化後的幾丁質外骨骼，在固定後，可用舒爾斯氏透明劑軟化，較爲適宜。因它有軟化，透明及漂白作用。

3. 堅厚的幾丁質殼，鱟，蜈蚣，蠍及巨形蜘蛛等，可用德蘭氏二氧化氯及硝酸混合液，它的軟化作用較强，但無透明作用。

4. 脊椎動物的爪，甲，角，蹄等角化物與柔軟組織相結合者，也可用德蘭氏，二氧化氯及硝酸混合液軟化。至於純粹的骨質及角質如脊椎動物的硬骨，及龜類的甲片等則可用硝酸水溶液脫去鈣質，而無需用軟化劑。

5. 少量的軟化劑，可依上列方法，在實驗室製造。簡便省事，無須向國外購買。

參　考　文　獻

1. Krause, R. 1926. Enzyklopädie der Mikroskopischen Technik. 3. Auflage 1. Band.

2. Romeis, B. 1943. Taschenbuch der Mikroskopischen Technik. 14. Auflage.

3. Schulze, P. 1922. Ein neues Verfahren zum Bleichen und Erweichen tierischer Hartgebilde.

4. Schulze, P. 1927-28. Zur Einbettungstechnik nach Diaphanol-Behandlung.

THE SECTIONING OF CHITIN AND LABORATORY PREPARATION OF THE CHITIN-MACERATING AGENT — DIAPHANOL

Wang Feng-chên

Department of Histology, First Army Medical College

On account of the highly sclerotized condition of the exoskeltion of insects and arthropods, histological sectioning of this material has always been considered difficult. Since the introduction of diaphanol this problem has been much simplified. In the present paper the various formulae for preparing the fixtive for chitinized material and laboratory procedure for preparing diaphanol are listed. By actual experiment it is shown that diaphanol, laboratory prepared, is as good as the imported material.